

# Array vizsgálatok alkalmazása vastagbél-daganat-specifikus biomarkerek azonosítása céljából

Doktori tézisek

**Dr. Wichmann Barnabás**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Béla, tudományos tanácsadó, az MTA doktora

Programvezető: Dr. Tulassay Zsolt, egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Sára, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Ponyi Tamás, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Sebestyén Anna, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Füle Tibor technikai szaktanácsadó, Ph.D.

Dr. Garami Miklós osztályvezető egyetemi docens, Ph.D.

**Budapest**

**2015**

# BEVEZETÉS

## A vastagbél tumorok előfordulása

Napjainkra a vastagbél daganatok diagnosztikája, terápiája, követése nagy fejlődésen ment át - sok esetben a nagy áteresztő képességű molekuláris technikáknak, mint például a microarray vizsgálatoknak köszönhetően - azonban még mindig nem tekinthető teljesen megoldottnak. Gyakori előfordulásuk miatt további kutatások szükségesek, hogy a máig nem teljesen feltérképezett patogenetikai és molekuláris biológiai hátterüket és eredetüket tisztázzuk. A modern társadalmakban lényegesen nagyobb arányban fordulnak elő vastagbél daganatos megbetegedések, a colorectális rák (CRC) mindkét nemben a második leggyakoribb előfordulású daganatos betegség. Az Egészségügyi Világszervezet becslései alapján, évente 1 361 000 új vastagbélrákos beteget diagnosztizálnak, és 694 000-en halnak meg a betegségben világszerte (Ferlay és mtsai. 2012). A vastagbélrák a második leggyakoribb rákos betegség és halálok Európában is, 2012-ben megközelítőleg 447 000 új vastagbélrákos megbetegedést, valamint 215 000 halálesetet regisztráltak (Ferlay és mtsai. 2013). A vastagbél daganatos megbetegedések hazánkban is a mortalitás és morbiditás vezető okai közé tartoznak, a colorectális rák hazánkban szintén mindkét nemben a második leggyakrabban halált okozó daganatos betegség. 2012-ben férfiaknál megközelítőleg 4 800, nőknél 3 700 új esetet regisztráltak, és megközelítőleg 2 600 férfi és 2 100 női halálesetet jegyeztek fel. Százezer főre vetítve, hazánkban férfiaknál 87, nőknél 45 a becsült előfordulási érték, amely a legmagasabbak között van a térség országaiban és teljes Európában is. A fentiekben ismertetett adatok tükrében a korai felismerés, a genetikailag eltérő daganatok elkülönítése és ennek következtében a terápiás lehetőségek hatékonyságának javítása alapvető fontosságú feladat. A korai felismerés fontosságára legjobban az 5 éves túlélési adatok világítanak rá: míg korai stádiumban 80-90%-os, nyirokcsomó áttétek esetén 60%-os, azonban a már előrehaladott, távoli szervi áttéttel rendelkező betegség esetén 10% alatti az 5 éves túlélési arány (O'Connell és mtsai. 2004).

Nagyszámú génexpressziójának vizsgálatára leggyakrabban a szisztematikus mRNS expressziós változások vizsgálatára alkalmas platformokat: a spotted cDNA, valamint a nagy-denzitású oligonukleotid microarray-t alkalmazzák. Az mRNS expressziós microarray-k segítségével lehetővé vált nagyszámú gén expressziójának összehasonlítása különböző

sejtekben, szövetekben, ugyanazon típusú sejtek/szövetek eltérő állapotaiban. A colorectális adenoma-diszplázia-karcinóma szekvencia során bekövetkező génexpressziós változások teljes genomszintű vizsgálatával a malignus átalakulás molekuláris hátteréről szerezhetünk pontosabb adatokat, ami hozzájárulhat a vastagbélrák korai felismeréséhez. PhD munkám során olyan transzkriptum sorozatot határoztam meg, amely alkalmas lehet a sporadikus vastagbélrák kialakulásában döntő fontosságú diszplázia-karcinóma átmenet (tranzíció) jellemezésére. Vizsgálataim során nemcsak teljes genom microarray és RT-PCR-es génexpressziós vizsgálatokat, hanem fehérjeszintű megerősítést is végeztem, és komplex bioinformatikai elemzést alkalmaztam.

## CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim során a következő kérdésekre kerestem a választ:

- Nagy teljesítményű génexpressziós array technológiával azonosítható-e olyan transzkriptum csoport, amely expressziós változása követi a Vogelstein-modellt?
- A fenti transzkriptum csoportban vannak-e olyan gének, amelyek expressziós változása érzékenyen és fajlagosan segíthet az egészséges/normális, adenomás és vastagbélrákos szöveti minták elkülönítésében? Az eltérések hám- vagy stromális eredete meghatározható-e?
- A transzkriptum sorozat alkalmazásával elkülöníthetőek-e a súlyosan diszplasztikus (high-grade) adenoma és korai vastagbélrákos minták?
- A transzkriptum csoport független mintaszetten (Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázis) történő tesztelés során is alkalmazhatónak mutatkozik-e?
- Céлом volt továbbá a génexpressziós array technológia eredményének független mintacsoporton, konvencionális RT-PCR módszerrel történő validációja.
- További célkitűzésem az azonosított transzkriptum csoport fehérjeszintű megerősítése volt szöveti mintákon, immunhisztokémiai módszerrel.
- Célul tűztem ki a kapott szöveti transzkriptum csoport elkülönítő képességének vérmintákon történő tesztelését is annak céljából, hogy a szöveti szinten talált elkülönítő gének perifériás szinten is alkalmasak-e a betegségcsoportok megkülönböztetésére.

# VIZSGÁLATI MINTÁK ÉS MÓDSZEREK

## Microarray vizsgálatok

Génexpressziós vizsgálatok segítségével lehetővé vált számos, a kolorektális adenoma-diszplázia-karcinóma szekvenciát jellemző jelátviteli útvonal azonosítása. A nagy áteresztő képességű microarray technika vastagbélrák esetében is alkalmas arra, hogy az aktuális tumoros milió génexpressziós mintázatát jellemezzük. Összesen 147 biopsziás mintát elemeztünk. A "tréning" microarray vizsgálat során összesen 53 mintát alkalmaztunk (11 egészséges, 9 low-grade diszplasztikus adenoma, 11 high-grade diszplasztikus adenoma, 10 korai CRC, 12 előrehaladott CRC). Microarray vizsgálataink adatai elérhetőek a Gene Expression Omnibus adatbázisban (hivatkozási azonosító: GSE4183). A későbbiekben újabb microarray mintasorozatot vontunk be vizsgálatainkba validáció céljából: "teszt" mintasorozatként összesen 94 (38 egészséges, 16 low-grade diszplasztikus adenoma, 13 high-grade diszplasztikus adenoma, 14 korai CRC, 13 előrehaladott CRC) minta került hibridizálásra. Az adatok szintén elérhetőek a Gene Expression Omnibus adatbázisban (hivatkozási azonosító: GSE37364). Vérminták esetében összesen 47 vérminta (16 egészséges, 12 adenoma és 19 CRC – 7 korai, 12 előrehaladott CRC) microarray elemzését végeztük el. A vizsgálatainkat a Regionális és Intézményi Tudományos és Kutatási Etikai Bizottság (TUKEB szám.: 69/2008) is jóváhagyta.

## Független Gene Expression Omnibus adatbázis adatok

A vizsgálatainkba bevont független microarray kísérletek adatait a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisából töltöttük le. Az összehasonlításhoz szintén HGU133 Plus2.0 microarray-n vizsgált biopsziás minták adatait használtuk fel. A vizsgálatokat végző kutatócsoportok a MIAME előírásoknak megfelelően közzétették a GEO adatbázisban vizsgálatuk eredeti adatait (azonosítók: GSE8671 (Sabates-Bellver és mtsai. 2007), GSE18105 (Matsuyama és mtsai. 2010)). A GSE8671 azonosítójú vizsgálat összesen 64 (32 egészséges és 32 adenomás) mintát, a GSE18105 azonosítójú vizsgálat összesen 111 (17 egészséges és 94 vastagbélrákos) mintát tartalmazott.

## **Valós idejű RT-PCR vizsgálatok**

A 11 transzkriptum mRNS expressziós mintázatának megerősítéséhez kereskedelmi forgalomban elérhető RT-PCR assay-eket alkalmaztuk. A validációs RT-PCR elemzésbe összesen 68 (20 egészséges, 13 low-grade diszplasztikus adenoma, 11 high-grade diszplasztikus adenoma, 10 korai CRC, 10 előrehaladott CRC, valamint 4 ismeretlen besorolású CRC) független (a korábbi microarray elemzéseinkben nem szereplő) mintát vontunk be. Mintánként 2,5 µg teljes RNS Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) felhasználásával történő reverz transzkripcióját követően valós idejű RT-PCR-t végeztünk 384 mintahelyes PCR lemezeken. A génspecifikus forward és reverz primerek, valamint a fluoreszcensen jelölt hidrolizációs próbák (Universal ProbeLibrary, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland, Basel) liofilizálásra kerültek a fenti PCR lemezekre. A legalkalmasabb referencia gén kiválasztásához RT-PCR vizsgálatainkban a következő 7 háztartási gént vizsgáltuk: a GAPDH-t, a B2M-t, a ACTB-t, a HPRT1-t, az RPL13A-t, a 18S-t és az YWHAZ-t.

## **Fehérje expressziós vizsgálatok**

Az említett mRNS microarray és RT-PCR technikák a gének működéséről és aktivitásáról szolgálnak adatokkal, azonban a fehérjék kifejeződéséről, a tényleges fenotípusról nem nyújtanak információt. Ezt a képet tovább árnyalják a fehérjék poszttranszlációs módosításai és sejten belüli lokalizációjuk változása. A microarray vizsgálat során kapott eredményeket ezért fehérjeszinten is szükséges validálni. Az előzetesen mRNS expressziós változások alapján kiválasztott gének fehérjetermékeinek immunhisztokémiai vizsgálata tissue microarray (TMA) lemezeken történt. A hét kiválasztott marker fehérjeszintű vizsgálatához formalin fixált, paraffinba ágyazott egészséges (n=10-12), adenoma (tubuláris és tubulovillózus; n=37-64) és vastagbélrákos (n=13-30) szövetmintákat használtunk. A metszetek kiértékelését digitális mikroszkóp (Pannoramic Viewer v:1.15.2) segítségével végeztük az alábbi szemikvantitatív pontozási (score-) rendszer alkalmazásával:

- nincs immunreakció a sejtek citoplazmájában (a hámban vagy a strómában) (-2)
- gyenge festődés a sejtek citoplazmájában (a hámban vagy a strómában) (0)
- közepes festődés a strómában (+1)
- erős immunreakció a sejtek citoplazmájában (a hámban vagy a strómában) (+2).

További immunhisztokémiai vizsgálatban összesen 35 egészséges, 75 adenomás (37 low-grade diszplasztikus és 38 high-grade diszplasztikus adenoma), valamint 58 vastagbélrákos

(29 Dukes' A-B, 29 Dukes' C-D stádiumú CRC) mintát elemeztünk szöveti microarray-n (Sipos és mtsai. 2014).

### **A vizsgálatok során alkalmazott statisztikai elemzések**

Microarray-k esetében a különböző diagnosztikus csoportok között eltérően expresszáldó géneket Significance Analysis of Microarray elemzéssel (SAM) határoztuk meg. Az említett módszer mellett a „nearest shrunken centroid” módszert (Prediction Analysis for microarrays - PAM) is alkalmaztuk a minták génexpressziós klasszifikációja során. A fenti módszerrel olyan részhalmazokat/transzkriptum csoportokat keresünk, amelyek az egyes diagnosztikai csoportokat a legjobban jellemzik (Tibshirani és mtsai. 2002). A feldolgozást, az adatbányászatot és a statisztikai elemzéseket R 2.15.0 környezetben végeztük (R Development Core Team, 2011), Bioconductor könyvtárak alkalmazásával. Hierarchikus cluster, diszkriminancia, főkomponens elemzéseket és logisztikus regressziót alkalmaztunk az egyes betegségcsoportokat legjobban elkülönítő transzkriptumok meghatározására és az elkülönítő képességük tesztelésére. Az RT-PCR eredmények kiértékelése során a génexpresszió relatív mennyiségi meghatározását végeztük. A fold change értékeléséhez  $\Delta\Delta\text{CT}$  módszert alkalmaztuk. A célgén expresszió normalizálásához a 18S riboszómális RNS-t alkalmaztuk belső kontrollként ( $\Delta\text{CT}$ ). Mind a microarray, mind az RT-PCR sorozat esetében multiple logisztikus regressziót alkalmaztunk a bináris (0-kontrol, 1-beteg állapot) diagnosztikai változók értékeinek meghatározására. A minta "beteg" állapotként való diagnosztizálásának valószínűségét (P) a következő megoldó képlet alkalmazásával végeztük:

$$X = \text{logit}(P) = \ln(P/(1-P)) = b_0 + b_1\Delta\text{CT}_1 + b_2\Delta\text{CT}_2 + \dots + b_n\Delta\text{CT}_n$$

A „maximum-likelihood” illeszkedés módszer során (empirikus) olyan együtthatókat  $\{b_i\}$  alkalmaztunk, amelyek meghatározzák a kapcsolatot X és a kísérleti mérések között  $\{\Delta\text{CT}_i\}$ . A „Receiving operating characteristic” (ROC) görbe elemzésére Medcalc 12.1 szoftvert alkalmaztuk annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a markersorozat elkülönítő hatását. Az elkülönítő képesség megállapításához meghatároztuk a transzkriptumsorozat szenzitivitását és specifitását is. Diszkriminancia elemzést is végeztünk az SPSS 20.0 szoftverrel, amelynek során a különböző mintacsoportok elkülönülését vizsgáltuk a markersorozat expressziója alapján. Az osztályozás/mintabesorolás helyességét és erősségét az ún. Leave-one-out klasszifikációval is ellenőriztük, valamint főkomponens elemzést is végeztünk. A klasszifikációs eredményeket bemutató táblázatban a megfelelően, illetve a nem megfelelően sorolódott minták mennyisége és százalékos arányuk is feltüntetésre került.

## **EREDMÉNYEK**

Megközelítőleg 58 000 transzkriptum expressziójának egyidejű vizsgálata során a legjobb elkülönítő képességűnek bizonyuló 11 marker (IL8, MMP3, IL1B, CHI3L1, GREM1, IL1RN, CXCL1, CXCL2, CA7 és SLC7A5) - egy kivételtől (COL12A1) eltekintve - bizonyítottan részt vesz a kolorektális karcinogenezisben és a betegség progressziójában. A CHI3L1 és a CXCL1 a karcinogenezissel, az IL8, a CXCL1, az SLC7A5 és az MMP3 a tumor növekedéssel és fejlődéssel, az IL8, a CHI3L1 és az SLC7A5 az angiogenezissel és metasztatikus invázióval, az IL1RN és az IL1B a betegség kiújulással hozható összefüggésbe. A microarray vizsgálatok esetében a mintacsoportok nagy pontossággal elkülöníthetők, amelyet a független minták RT-PCR-es vizsgálata is megerősített.

### **Az elkülönítő markersorozat azonosítása a „tréning” microarray sorozat mintáin**

A „tréning” mintacsoport esetében (53 microarray: 11 egészséges/normális, 20 adenomás és 22 CRC-s minta), a 11 markerből álló transzkriptumsorozat sikeresen alkalmazható volt a különböző betegcsoportok elkülönítésére. A diszkriminancia elemzés eredménye alapján a minták 96,2%-a a csoportbeosztásnak megfelelően volt besorolható, mindössze két vastagbélrákos minta, az összes minta 4,5-4,5%-a, sorolódott át az egészséges/normális és az adenoma csoportokba.

A mintasorozat elkülönítő képességének vizsgálatokor többváltozós logisztikus regressziót is alkalmaztunk. A páros összehasonlítások során ROC görbe elemzést hajtottunk végre a 11 elkülönítő marker esetén. Egészséges/normális és adenoma minták összehasonlításakor 100%-os specificitást és szenzitivitást tapasztaltunk. Egészséges/normális és CRC-s minták esetében a szenzitivitás 95,5%-ra csökkent, azonban a specificitás értéke 100%-os maradt. Ugyanezeket a százalékos értékeket kaptuk adenomás és CRC-s minták összehasonlításakor is. Az ROC elemzés során észlelt elkülönítő képesség erősségének jellemzéséhez Youden-indexet alkalmaztunk, amely 0,955 és 1 között változott.

### **Az azonosított markerek vizsgálata a „teszt” microarray mintasorozaton**

A „teszt” mintacsoport esetében (94 microarray: 38 egészséges/normális, 29 adenomás és 27 CRC-s minta) a diszkriminancia elemzés eredménye alapján a mintáknak a 93,6%-a a csoportbeosztásoknak megfelelően sorolódott be, összesen négy adenomás és két CRC-s minta besorolódása volt helytelen, ami 86,2%-os és 92,6%-os besorolási megfelelést jelent.

A mintasorozat elkülönítő képességének tesztelésekor többváltozós logisztikus regressziót is alkalmaztunk. A páros összehasonlítások során, az ROC görbe elemzés alapján, az egészséges és a CRC-s minták összehasonlításakor 100%-os szenzitivitás és specificitás figyeltünk meg. A markerek alkalmazásával az egészséges és az adenomás minták összehasonlításakor 100%-os specificitást és 96,6%-os szenzitivitást kaptunk. A benignus adenoma és a malignus CRC-s colonminták összehasonlításakor a specificitás mérsékeltebb (89,7%), azonban a szenzitivitás (100%) kiváló értéket mutatott. A ROC elemzés során észlelt elkülönítő képesség erősségének jellemzése szintén Youden-index segítségével történt, amely értéke 0,89 és 1 között változott.

### **A GEO adatbázisból letöltött mintasorozatok független mintasorozatként való alkalmazása**

A GSE8671 azonosítójú elemzésbe 32 egészséges/normális és 32 adenomás mintát vontak be. A vizsgálataink során azonosított 11 transzkriptum alkalmazásával a 32 adenomás és 32 egészséges független biopsziás minta 100%-os specificitással és szenzitivitással bizonyult elkülöníthetőnek. További *in silico* vizsgálatainkban 94 CRC-s és 17 egészséges/normális szövetmintát hasonlítottunk össze (GSE18105 tanulmány). Az általunk azonosított 11 transzkriptum alkalmazása 100%-os specificitást és szenzitivitást eredményezett a fenti független CRC-s és egészséges minták összehasonlításakor. További *in silico* vizsgálatunk tárgyát képezte a markersorozat CRC specifikusságának tisztázása érdekében, a GSE39582 azonosító számú (Marisa L. et al. 2013) génexpressziós microarray mintasorozat 19 egészséges mucosa, valamint kiválasztott 24 CIMP- és 13 CIMP+ és 14 MSI és 22 MSS vastagbélrák mintájának összehasonlítása.

### **Az azonosított markerek vizsgálata független mintasorozaton valós idejű RT-PCR módszerrel**

Az RT-PCR vizsgálatokat a 11 transzkriptum esetében független biopsziás mintákon végeztük el. A mintasorozat esetében (68 RT-PCR: 20 egészséges/normális, 24 adenomás és 24 CRC-s minta) a legkisebb  $\Delta CT$  szórással rendelkező 18S riboszomális RNS-t választottuk belső kontrollnak a 7 potenciális háztartási gén közül. A 11 marker alkalmazásával a diszkriminancia elemzés során a minták 95,6%-a sorolódott be helyesen. Logisztikus regressziót követően csak páros összehasonlításokat vizsgáltunk: ROC elemzéssel 100% szenzitivitást és specificitást észleltünk az egészséges és a CRC-s minták összehasonlításakor. Az egészséges és az adenomás minták összehasonlítása során 95,8%-os szenzitivitást és 95%-



os specificitást tapasztaltunk. Hasonlóan magas értékeket kaptunk a benignus adenoma és a malignus CRC-s minták összehasonlítása során is, hiszen 95,8%-os szenzitivitással és 100%-os specificitással különült el a két mintasorozat. A ROC elemzés során észlelt elkülönítő képessége erősségének jellemzésére szintén Youden-indexet határoztunk meg, amelynek értéke 0,958 és 1 között változott.

### **High-grade diszplastikus adenoma és korai CRC minták összehasonlítása**

A "tréning" mintasorozat esetén a 11 elemből álló marker csoport alkalmazásával a high-grade diszplastikus adenomás (n=11) és a korai CRC-s (n=10) biopsziás minták jól elkülöníthetőek voltak (specificitás: 90,9%, szenzitivitás: 100%). A független "teszt" mintasorozat esetén a high-grade diszplastikus adenomás (n=13) és a korai CRC-s (n=14) biopsziás mintákat 92,3%-os specificitással és 100%-os szenzitivitással különítettük el. A két mintasorozat együttes alkalmazásakor összesen 24 high-grade diszplastikus adenoma és 24 korai CRC (Dukes' A vagy B stádiumú) mintán, 83,3%-os specificitást és 100%-os szenzitivitást értünk el. Hasonlóan magas specificitás és szenzitivitás értékeket kaptunk az RT-PCR vizsgálat során is, amelyben összesen 11 high-grade diszplastikus adenomás és 10 korai CRC-s minta szerepelt. A hierarchikus cluster elemzés eredménye alapján a 10 korai CRC-s minta megfelelő diagnosztikai csoportba sorolódott, míg három adenomás minta (a 6-os, a 10-es és a 11-es sorszámú) tévesen átsorolódott az adenomás csoportból a CRC-s mintacsoportba. A betegek utánkövetése azonban rávilágított arra, hogy a 6-os és 11-es minta valójában *in situ* karcinómának bizonyult az újabb mintavétel után. A független RT-PCR-es validáció során a high-grade diszplastikus adenomás (n=11) és a korai CRC-s (n=10) biopsziás minták 90,9%-os specificitással és 100%-os szenzitivitással különültek el. Az utánkövetés eredményeképpen két adenomás (valójában *in situ* karcinomás) minta a CRC csoportba került, ezért a ROC statisztika esetében új logisztikus regressziós képlet számítását tartottuk szükségesnek, ezért megismételtük az elemzést az új csoportosítással is. Az új elemzés során 9 high-grade diszpláziás adenomás és 12 korai CRC-s mintát hasonlítottunk össze, amelyek 100%-os szenzitivitással és specificitással bizonyultak elkülöníthetőnek. Az utánkövetés során tapasztalt diagnosztikus átsorolódást figyelembe véve a 11 marker korai CRC-t elkülönítő képessége erősebbnek adódott.

### **Fehérjeszintű validáció szövet microarray (TMA) rendszeren**

Fehérje expressziós vizsgálataink során szöveti microarray-ken (Tissue Microarray/TMA) immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A TMA-k egészséges,

adenomás és vastagbélrákos szöveti mintákat tartalmaztak. A potenciális fehérjemarkerekhez egyedi antitesteket választottunk. Az mRNS vizsgálataink alapján hét fehérjemarkert választottunk ki (CA7, COL12A1, IL8, MMP3, SLC7A5, CXCL1-2-3, IL1RN). Az immunhisztokémiai reakciókat empirikus score rendszer segítségével értékeltük.

### **Az MMP3 és a CXCL1 expresszió adenomás és vastagbél tumoros mintákban**

Szöveti microarray rendszeren összesen 35 egészséges, 75 adenomás (37 low-grade diszplasztikus és 38 high-grade diszplasztikus adenoma), valamint 58 vastagbélrákos (29 Dukes' A-B, 29 Dukes' C-D stádiumú CRC) mintát elemeztünk (Sipos és mtsai. 2014). A jó- és rosszindulatú daganatos szövetminták elkülönítése klinikai szempontból is fontos a malignus elváltozás korai felismerése miatt. A lamina propriában való expressziója alapján az MMP3 szignifikáns különbséget mutat ( $p < 0,001$ ) a diszplázia-karcinóma átmenet során. A fenti marker már önmagában is elegendő arra, hogy 98,2%-os bizonyossággal elkülönítse a benignus és malignus mintákat. Hasonlóan erős elkülönítő markernek bizonyult a hámban és a lamina propriában kifejeződő CXCL1 is, amelyet az MMP3-al kombinálva kimagasló elkülönítő képességet tapasztaltunk. Az MMP3 fehérje expressziója a lamina propriában az adenoma-diszplázia-karcinóma átmenet során erősödött. A CXCL1 fehérje immunreakció vastagbélrákban erősebb volt, mint adenomában, mind a hám, mind a lamina propria viszonylatában.

Fisher-egzakt teszt eredményei alapján ( $p < 0,001$ ) a szemikvantitív CXCL1 és MMP3 fehérje expresszió a lamina propriában mutatta a legerősebb pozitív irányú emelkedést az adenoma-diszplázia-karcinóma szekvencia előrehaladásával párhuzamosan. Az 139 benignus és malignus colon mintából 113 esetben kaptunk értékelhető expressziót. Az adenoma minták 98,6%-a ( $n=69$ ), valamint a CRC minták 97,7%-a ( $n=44$ ) megfelelő diagnosztikai csoportba sorolódott. Mindkét csoport esetében 1-1 minta besorolása volt helytelen.

A CXCL1 és az MMP3 lamina propriabeli markerekkel végzett immunreakciók eredményei alapján a high-grade diszplasztikus adenoma (AD-HGD) és a korai vastagbélrákos minták (CRC-A) is elkülöníthetőnek bizonyultak. A CXCL1 esetében az AD-HGD minták 11,43% -a, a CRC-A minták 11,11%-a sorolódott be helytelenül, míg az MMP3 esetében nem tapasztaltunk eltérő kategorizálódást.

### **Az elkülönítő szöveti markersorozat elkülönítő képességének vizsgálata vérmintákon**

Szöveti szinten a csoportok elkülönítésére alkalmas 11 transzkriptumból álló sorozatot vérmintákon is megvizsgáltuk diszkriminancia elemzés alkalmazásával. A markerek együttes

alkalmazása 58,3-73,7% közötti pontossággal sorolta be a vérmintákat a megfelelő diagnosztikai csoportba. A legnagyobb problémát mindkét összehasonlításnál az adenomák felismerése/helyes besorolása jelenti, az adenoma minták ugyanis 40%-t meghaladóan sorolódtak az egészséges/normális, illetve a vastagbélrákos csoportba. Sok tanulmányban azonban csak egészséges/normális és vastagbélrákos minták összehasonlítása szerepel. Az egészséges és a vastagbélrákos minták összehasonlításakor 93,8%-os és 84,2%-os elkülönítést tapasztaltunk. Adenomás és vastagbélrákos csoport együttes kezelése esetén, mint beteg csoport, 80% fölötti megfelelő csoportba sorolódást figyelhetünk meg. Logisztikus regressziót követően csak páros összehasonlításokat vizsgáltunk. A ROC elemzés 84,2%-os szenzitivitást és 100%-os specificitást mutatott egészséges és CRC minták összehasonlításakor. Az egészséges és az adenomás minták összehasonlítása során 78,9%-os szenzitivitást és 100%-os specificitást észleltünk. A benignus adenoma és a malignus CRC-s colonmintákat 91,7%-os szenzitivitással és 75%-os specificitással különítette el a 11 tagú markercsoport.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeinket összefoglalva a következő következtetéseket vonhatjuk le:

- Egészséges/normális, benignus adenoma és malignus vastagbél tumoros szöveti minták teljes genomszintű microarray vizsgálatával az egyes mintacsoportok közt jelentős génexpressziós változásokat tudtunk azonosítani.
- A microarray vizsgálatok ("tréning" és "teszt" sorozatok) alkalmasnak bizonyultak arra, hogy egy olyan 11 tagú markercsoportot határozzunk meg, amely mindkét mintasorozaton hasonló eltéréseket mutat az egészséges és a különböző betegség stádiumok között. A fenti markerek mindkét vizsgálatban/mintasorozaton - a daganatokban csökkent működésű CA7 kivételével - magasabb expressziót mutattak a benignus és malignus elváltozásokban egészséges/normális állapothoz képest.
- Az azonosított transzkriptumsorozat alkalmasnak bizonyult a high-grade diszplastikus adenoma és a korai vastagbélrákos minták elkülönítésére is.
- Eredményeinket sikeresen megerősítettük *in silico* adatok bevonásával is, bár az *in silico* adatbázisban fellelhető eredmények vagy csak benignus adenoma vagy csak malignus vastagbél tumor minták normális kontroll mintákkal történő összehasonlítását tették lehetővé. Az általunk azonosított 11 marker erős elkülönítő képessége az *in silico* vizsgálatokban is igazolódott.

- Sikeresen bizonyítottuk, hogy a vizsgált markerek együttes alkalmazása sikeresen és nagy megbízhatósággal különíti el az egyes diagnosztikai csoportokat a microarray és a független RT-PCR vizsgálatok során is.
- Megerősítő immunhisztokémiai vizsgálataink során, minden marker esetében hasonló fehérje expressziós mintázati eltérést tapasztaltunk, mint az mRNS expressziós vizsgálatok során.
- A szöveti markersorozat vérmintákon is nagyfokú elkülönítést mutatott egészséges/normális és beteg minták összehasonlításakor. A betegcsoport benignus és malignus összetevőinek szétbontását követően azonban, a benignus adenomaminták jelentős hányada tévesen - az egészséges, illetve a vastagbél tumoros diagnosztikai csoportba – sorolódott be. A markersorozat tehát vérmintákon csak bizonyos megkötések mellett bizonyult alkalmazhatónak.

## SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

### Az értekezés témájában, nemzetközi tudományos folyóiratban megjelent közlemények

1. Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B. Dysplasia-Carcinoma Transition Specific Transcripts in Colonic Biopsy Samples. *PLOS ONE* 7:(11) p. e48547. (2012)

**IF:3,73**

2. Sipos F, Germann TM, Wichmann B, Galamb O, Spisák S, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B, Múzes G. MMP3 and CXCL1 are potent stromal protein markers of dysplasia-carcinoma transition in sporadic colorectal cancer. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER PREVENTION* 23:(5) pp. 336-343. (2014)

**IF: 2,764**

### Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó, nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

3. Spisák S, Galamb B, Sipos F, Galamb O, Wichmann B, Solymosi N, Nemes B, Molnár J, Tulassay ZS, Molnár B. Applicability of antibody and mRNA expression microarrays for identifying diagnostic and progression markers of early and late stage colorectal cancer. *DISEASE MARKERS* 28:(1) pp. 1-14. (2010)

**IF:1,723**

4. Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, Wichmann B, Krenács T, Valcz G, Tulassay ZS, Molnár B. Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. *BRITISH JOURNAL OF CANCER* 102:(4) pp. 765-773. (2010)

**IF: 4,831**

5. Firneisz G, Varga T, Lengyel G, Feher J, Ghyczy D, Wichmann B, Selmei L, Tulassay Z, Racz K, Somogyi A. Serum Dipeptidyl Peptidase-4 Activity in Insulin Resistant Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Novel Liver Disease Biomarker. *PLOS ONE* 5:(8) p. e12226. (2010)

**IF: 4,411**

6. Sipos F, Galamb O, Wichmann B, Krenacs T, Toth K, Leiszter K, Muzes G, Zagoni T, Tulassay Z, Molnar B. Peripheral blood based discrimination of ulcerative colitis and Crohn's disease from non-IBD colitis by genome-wide gene expression profiling. *DISEASE MARKERS* 30:(1) pp. 1-17. (2011)

**IF: 1,642**

7. Toth K, Galamb O, Spisak S, Wichmann B, Sipos F, Valcz G, Leiszter K, Molnar B, Tulassay Z. The Influence of Methylated Septin 9 Gene on RNA and Protein Level in Colorectal Cancer. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 17:(3) pp. 503-509. (2011)

**IF: 1,366**

8. Valcz G, Krenacs T, Sipos F, Patai AV, Wichmann B, Leiszter K, Toth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymasi K, Masszi T, Molnar B, Tulassay Z. Lymphoid aggregates may contribute to the migration and epithelial commitment of bone marrow-derived cells in colonic mucosa. *JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY* 64:(9) pp. 771-775. (2011)

**IF: 2,306**

9. Varga T, Somogyi A, Barna G, Wichmann B, Nagy G, Racz K, Selmei L, Firneisz G. Higher Serum DPP-4 Enzyme Activity and Decreased Lymphocyte CD26 Expression in Type 1 Diabetes. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 17:(4) pp. 925-930. (2011)

**IF: 1,366**

10. Valcz G, Sipos F, Krenacs T, Molnar J, Patai AV, Leiszter K, Toth K, Wichmann B, Molnar B, Tulassay Z. Increase of alpha-SMA(+) and CK (+) Cells as an Early Sign of Epithelial-Mesenchymal Transition during Colorectal Carcinogenesis. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 18:(2) pp. 371-376. (2012)

**IF: 1,555**

11. Toth K, Sipos F, Kalmar A, Patai AV, Wichmann B, Stoeck R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnar B. Detection of Methylated SEPT9 in Plasma Is a Reliable Screening Method for Both Left- and Right-Sided Colon Cancers. *PLOS ONE* 7:(9) p. e46000. (2012)

**IF: 3,73**

12. Spisák S, Kalmár A, Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Péterfia B, Csabai I, Kovalszky I, Semsey S, Tulassay Z, Molnár B. Genome-Wide Screening of Genes Regulated by DNA Methylation in Colon Cancer Development. *PLOS ONE* 7:(10) Paper e46215. 11 p. (2012)

**IF: 3,73**

13. Teleki I, Krenacs T, Szasz MA, Kulka J, Wichmann B, Leo C, Papassotiropoulos B, Riemenschnitter C, Moch H, Varga Z. The potential prognostic value of connexin 26 and 46 expression in neoadjuvant-treated breast cancer. *BMC CANCER* 13: Paper 50. 13 p. (2013)

**IF: 3,319**

14. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Kalmár A, Patai AV, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z. Sporadic Colorectal Cancer Development Shows Rejuvenescence Regarding Epithelial Proliferation and Apoptosis. *PLOS ONE* 8:(10) Paper e74140. 10 p. (2013)

**IF: 3,534**

15. Fűri I, Sipos F, Spisák S, Kiszner G, Wichmann B, Schöller A, Tulassay Z, Múzes G, Molnár B. Association of self-DNA mediated TLR9-related gene-, DNA methyltransferase and cytokeratin protein expression alterations in HT29-cells to DNA fragment length and methylation status. *THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL* 2013:(2013) Paper 293296. 8 p. (2013)

**IF: 1,219**

16. Kiszner G, Wichmann B, Nemeth IB, Varga E, Meggyeshazi N, Teleki I, Balla P, Maros ME, Penksza K, Krenacs T. Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas. *VIRCHOWS ARCHIV-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY* 464:(5) pp. 603-612. (2014)

**IF: 2,56**

17. Valcz G, Patai AV, Kalmár A, Péterfia B, Fűri I, Wichmann B, Múzes G, Sipos F, Krenács T, Mihály E, Spisák S, Molnár B, Tulassay Z. Myofibroblast-Derived SFRP1 as Potential Inhibitor of Colorectal Carcinoma Field Effect. *PLOS ONE* 9:(11) Paper e106143. 8 p. (2014)

**IF: 3,534**

18. Toth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmar A, Wichmann B, Leiszter K, Valcz G, Juhasz M, Miheller P, Patai AV, Tulassay Z, Molnar B. Detection of methylated septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. *PLOS ONE* 9:(12) Paper e115415. 19 p. (2014)

**IF: 3,534**

19. Múzes G, Sipos F, Fűri I, Constantinovits M, Spisák S, Wichmann B, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. Preconditioning with intravenous colitic cell-free DNA prevents DSS-colitis by altering TLR9-associated gene expression profile. *DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES* 59:(12) pp. 2935-2946. (2014)

**IF: 2,55**

20. Sipos F, Múzes G, Fűri I, Spisák S, Wichmann B, Germann TM, Constantinovits M, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. Intravenous administration of a single-dose free-circulating DNA of colitic origin improves severe murine DSS-colitis. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 20:(4) pp. 867-877. (2014)

**IF: 1,806**

21. Kalmar A, Peterfia B, Wichmann B, Patai AV, Bartak BK, Nagy ZB, Furi I, Tulassay Z, Molnar B. Comparison of Automated and Manual DNA Isolation Methods for DNA Methylation Analysis of Biopsy, Fresh Frozen, and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Colorectal Cancer Samples. *JOURNAL OF LABORATORY AUTOMATION* In press: p. In press. 10 p. (2015)

**IF:1,5**

22. Leiszter K, Sipos F, Galamb O, Krenacs T, Veres G, Wichmann B, Furi I, Kalmar A, Patai AV, Toth K, Valcz G, Tulassay Z, Molnar B. Promoter Hypermethylation-Related Reduced Somatostatin Production Promotes Uncontrolled Cell Proliferation in Colorectal Cancer.

*PLOS ONE* 10:(2) p. e0118332. (2015)

**IF: 3,534**

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik segítettek PhD munkám elkészítését:

Programvezetőmnek, **Prof. Dr. Tulassay Zsolt** és kutatócsoport vezetőmnek **Prof. Dr. Rácz Károly** egyetemi tanárnak,

- és témavezetőmnek, **Dr. Molnár Béla** tudományos tanácsadónak, hogy lehetővé tették és támogatták PhD munkám elkészítését a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján;

- **Dr. Müllner Katalin** és **Dr. Igaz Péter** házi opponenseknek PhD dolgozatom alapos áttekintéséért;
- **Udvardyné Dr. Galamb Orsolyának, Dr. Sipos Ferencnek és Kalmár Alexandrának** szakmai segítségéért, tanácsaiért;
- **Dr. Valcz Gábornak és Dr. Krenács Tibornak** a szakmai és a szöveti microarray vizsgálatokban nyújtott elengedhetetlen segítségéért;
- **Kónyáné Farkas Gabriella** szakasszisztensnek a gyakorlati munkámban nyújtott segítségükért;
- **a Sejtanalitika Laboratórium** összes dolgozójának támogatásukért; és végül, de nem utolsósorban köszönöm **Családomnak**.